

双参宁心方的正常与心肌缺血模型大鼠血清对 缺氧/复氧 H9C2 细胞作用的比较

李丹, 韩笑, 侯金才, 刘建勋*

(中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

[摘要] **目的:**比较大鼠在正常状态与心肌缺血状态下制备的双参宁心方(SSNX)空白及含药血清对体外缺氧/复氧 H9C2 心肌细胞活力的影响。**方法:**分别设立正常组、心肌缺血模型组。大鼠心肌缺血模型由冠状动脉结扎法建立,术后缝合伤口继续喂养。术后 2 h 除正常空白、模型空白、模型假手术组给予生理盐水外,均按高、中、低剂量(180,90,45 mg·kg⁻¹)分别 ig 给予 SSNX 5 日。末次给药后 30,90,150 min 分批处死大鼠,分别制备正常及模型血清。将其作用于缺氧/复氧 H9C2 细胞。MTT 法检测 H9C2 细胞活力。**结果:**正常空白血清与模型空白血清对缺氧/复氧 H9C2 心肌细胞活力影响差异明显($P < 0.05$),正常动物 SSNX 含药血清与心肌缺血模型动物 SSNX 含药血清均有提高缺氧/复氧 H9C2 心肌细胞活力的作用,分别与正常动物空白血清及模型动物血清比较($P < 0.05$);各时间点正常含药血清与相应时间点模型含药血清相比更显著提高了 H9C2 心肌细胞活力。**结论:**2 种方法制备的 SSNX 血清对体外缺氧/复氧 H9C2 心肌细胞活力的作用趋势一致,但强度有一定差异。

[关键词] 正常血清;心肌缺血病理模型血清;缺氧/复氧 H9C2 心肌细胞;细胞活力;双参宁心方

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0127-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110920.1429.003 **[网络出版时间]** 2011-09-20 14:29

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110920.1429.003.html>

Comparison of Effects of Shuangshen Ningxin Serum Obtained from Normal Rat and Myocardial Ischemia Rat on H/R H9C2 Myocardial Cells

LI Dan, HAN Xiao, HOU Jin-cai, LIU Jian-xun*

(Xiyuan Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the effects of pathological model Shuangshen Ningxin (SSNX) serum with normal SSNX serum on hypoxia/reoxygenation (H/R) injury H9C2 cell vitality. **Method:** Model rat of myocardial ischemia injury was established by coronary arterial ligating. Anterior descending branch of coronary artery was ligated. Except for normal blank, model blank, sham operation group, Normal rats and model rats are consecutively gavaged with SSNX at high, medium and low doses 2 h after the operation for 5 days consecutively. Collect blood from abdominal aorta 30, 90 and 150 min after last drug administration, and prepare serum. Construct H9C2 myocardial cell H/R injury model. Respectively administrate serums containing drugs from normal rat and model rat to H/R H9C2 cells. Determine the cell vitality by using MTT method. **Result:** There is a difference between normal blank serum group to model blank serum group in cell vitality ($P < 0.05$). Compared to normal blank and model blank group, cell activity SSNX serum group of normal and myocardium ischemia rat model are obviously different

[收稿日期] 20110324(017)

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(30830118);国家科技重大专项“重大新药创制”项目(2009ZX09303, 2009ZX09301-005-2-11)

[通讯作者] *刘建勋,博士,研究员,从事心脑血管药理学研究, Tel:010-62874049, E-mail:liujx0324@sina.com

($P < 0.05$); and the effects of SSNX serum group of normal is better than group of model at different time points ($P < 0.05$). **Conclusion:** The effects of SSNX serum prepared by two ways, is analogous on the role in the trend, but is different on degree.

[**Key words**] normal serum; myocardium ischemia model rat serum; H/R injury H9C2 cell; cell vitality; Shuangshen Ningxin

目前,中药血清药理学方法通常采用正常动物口饲给药后采血,制备含药血清,观察其对体外细胞的作用。本实验分别采用大鼠正常状态下给药后制备的含药血清(以下简称正常血清)及心肌缺血病理模型给药后制备的含药血清(以下简称模型血清)作用于缺氧/复氧 H9C2 心肌细胞,观察两种方法制备血清的药效差别,探索更为准确、合理的中药血清药理学方法。

双参宁心方(SSNX)为人参、丹参、元胡 3 药的有效组分提取物(人参总皂苷、丹参总酚酸、元胡总生物碱)组成。由本实验室研发,前期工作证明,该方可扩张冠脉血管,降低冠脉阻力,增加冠脉血流量,降低心肌耗氧量,改善心肌的供血供氧,调整心脏血管的顺应性,对心血管系统起调整和改善作用^[1-2]。并抵抗心肌细胞 Ca^{2+} 超载,抑制其胞内受体 CaM 及 Ca^{2+} /CaM 依赖性蛋白激酶 CaMPK II δ 的活性,抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α),细胞间黏附分子-1(ICAM-1)过量分泌^[3-4]。研究表明,该方是治疗心肌缺血/再灌注损伤的有效中药方剂。

1 材料

1.1 细胞株 H9C2 大鼠心肌细胞株,购于协和医科大学细胞试验中心。

1.2 动物 健康雄性 SD 大鼠 168 只,体重(220 \pm 10) g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证编号 SCXX(京)2006-0009。

1.3 药物与试剂 SSNX 为提取人参、丹参、元胡中人参总皂苷(以人参皂苷 Re 计 65%,20091224)、丹参总酚酸(以丹酚酸 B 计 78%,20091012)、元胡总生物碱(以延胡索乙素计 40%,20100321),按一定比例配伍而成,本实验室提供。45 mg SSNX 提取物相当于 4.18 g 生药,大鼠最低药效剂量为 22.5 mg \cdot kg⁻¹。胰酶(美国 Gibco 公司,批号 27250018)、DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号 866169)、胎牛血清(美国 Gibco 公司)。

1.4 仪器 550 型酶标仪(日本 RIO-RAD 公司),HPIAS-1000 型病理图像分析仪(北京空海公司),

LST003 型全自动生化分析仪(日立公司)。371 型 CO₂ 培养箱(Thermo),SH1 显微镜(Olympus),IECCL31R 型离心机(Thermo),SHY-2A 恒温水浴振荡器(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂),超净工作台(苏州净化设备厂)。

2 方法

2.1 正常大鼠 SSNX 含药血清制备 正常 SD 大鼠给 SSNX 按高、中、低剂量(180,90,45 mg \cdot kg⁻¹) ig,连续 5 d,1 次/d;空白组给予等容积生理盐水。分别在末次给药后 30,90,150 min 经腹主动脉取血,自然分离血清,56 $^{\circ}$ C 灭活 30 min,0.2 μ m 滤器过滤除菌,所得血清 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.2 模型大鼠含药血清(MSSNX)的制备 首先建立大鼠心肌缺血模型:4% 水合氯醛腹腔麻醉大鼠,仰卧位固定,第 4、5 肋间钝性分离肌层,肋间打开胸腔,挤出心脏,结扎左冠状动脉前降支近根部,迅速把心脏放回胸腔,轻轻按压胸腔,待其回复心跳和呼吸后缝合胸壁。假手术组将心脏挤出不结扎。然后给予 SSNX,给药方式方法均同正常组大鼠。所得血清分为 11 组:模型空白血清组、假手术空白血清组、MSSNX 30 min 高、中、低剂量组、MSSNX 90 min 高、中、低剂量组、MSSNX 150 min 高、中、低剂量组,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。取血后摘取大鼠心脏,生理盐水洗净血液,称重,均匀切成 5 片,N-BT 染色,图像分析仪计算心肌梗死面积。

2.3 2 种方法制备的血清作用于缺氧/复氧心肌细胞的血清药理学方法

2.3.1 H9C2 心肌细胞细胞培养及缺氧 4 h/复氧 2 h 损伤模型的建立 将 H9C2 心肌细胞株接种于 96 孔培养板中,含 10% 胎牛血清高糖 DMEM 培养基培养 2~3 d 后细胞基本融合成片,选择分布均匀、生长状态良好的细胞进行实验。缺氧/复氧损伤模型:洗净旧培养基,换成 N₂ 饱和的无糖培养液,置自制密闭盒中持续通以 950 mL \cdot L⁻¹ N₂ + 50 mL \cdot L⁻¹ CO₂ 混合气 0.5 h,充分排尽盒中残余氧气,放入 50 mL \cdot L⁻¹ CO₂ 培养箱中培养 4 h 后,取出换为含 20%

正常、模型大鼠各组血清的 DMEM 培养液继续培养 2 h。复氧结束后,MTT 法检测心肌细胞活力。并设未缺氧对照细胞组,实验重复 3 次。

2.3.2 细胞实验分组:与整体动物实验中分组对应:①正常血清组:缺氧/复氧正常空白血清组、缺氧/复氧正常 SSNX 含药血清组(9 组),共 10 组。②模型血清组:缺氧/复氧模型空白血清组、缺氧/复氧假手术空白血清组、缺氧/复氧模型 SSNX 含药血清组(9 组),共 11 组。③未缺氧正常对照组:加入 20% 大鼠空白血清的 DMEM 培养液。

2.4 统计方法 数值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。SPSS 18.0 软件作单因素方差分析和独立样本 t 检验统计分析。 $P < 0.05$ 有统计意义。

3 结果

3.1 SSNX 正常大鼠含药血清对 H9C2 心肌细胞活力的影响 缺氧/复氧损伤后 H9C2 心肌细胞活力下降,正常血清各组均对细胞活力有显著提高作用,与正常空白组相比差异显著($P < 0.05$),见表 1。

表 1 SSNX 正常大鼠含药血清对 H9C2 心肌细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量	末次给药后取血	心肌细胞活力
	/mg·kg ⁻¹	时间点/min	
未缺氧空白	-	-	134.91 ± 9.73 ¹⁾
正常空白	-	-	100
NSSNX	180	30	113.11 ± 9.30 ¹⁾
	90	30	112.25 ± 8.31 ¹⁾
	45	30	104.68 ± 4.76 ¹⁾
	180	90	116.57 ± 11.38 ¹⁾
	90	90	113.11 ± 8.46 ¹⁾
	45	90	108.57 ± 5.40 ¹⁾
	180	150	109.51 ± 4.91 ¹⁾
	90	150	108.93 ± 7.33 ¹⁾
	45	150	107.20 ± 4.59 ¹⁾

注:与正常空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 SSNX 模型大鼠含药血清对 H9C2 心肌细胞活力的影响 模型空白血清组与假手术空白血清组作用于细胞结果差异明显,具有统计学意义($P < 0.05$);SSNX 模型大鼠含药血清各时间点高、中剂量组能显著提高 H9C2 心肌细胞活力($P < 0.05$),与模型空白组相比有显著性差异($P < 0.05$),见表 2。

表 2 心肌缺血模型大鼠 SSNX 含药血清对 H9C2 心肌细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量	末次给药后取血	心肌细胞活力
	/mg·kg ⁻¹	时间点/min	
未缺氧空白	-	-	131.72 ± 11.08 ¹⁾
模型空白	-	-	90.60 ± 7.00 ¹⁾
假手术空白	-	-	100
MSSNX	180	30	103.72 ± 5.37 ¹⁾
	90	30	103.72 ± 7.24 ¹⁾
	45	30	95.5 ± 5.36
	180	90	105.05 ± 5.20 ¹⁾
	90	90	104.35 ± 9.19 ¹⁾
	45	90	95.37 ± 3.92
	180	150	103.02 ± 6.60 ¹⁾
	90	150	101.89 ± 4.46 ¹⁾
	45	150	97.47 ± 4.34

注:与模型空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

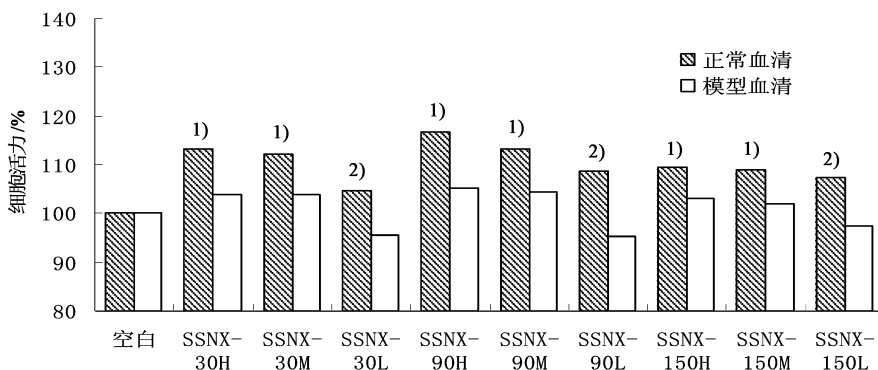
3.3 SSNX 对大鼠心肌缺血损伤模型心肌缺血面积及 LDH 漏出率的影响 经 N-BT 染色后,正常心肌染成暗蓝色,梗死区心肌不着色。缺血模型组梗死严重,与假手术组相比具统计学意义($P < 0.05$)。受缺血刺激后 LDH 大量漏出,与假手术组相比具统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

3.4 正常血清与模型血清对 H9C2 心肌细胞活力的影响比较 各时间点、各剂量的模型含药血清与正常含药血清相比,细胞活力抑制率均差异显著:各时间点正常含药血清与相应时间点模型含药血清相比更显著提高了 H9C2 心肌细胞活力($P < 0.05$, 图 1)。

表 3 SSNX 对大鼠心肌缺血损伤模型心肌缺血面积及 LDH 漏出率的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量	末次给药后取血	心肌缺血面积	LDH 漏出率
	/mg·kg ⁻¹	时间点/min	/mm ²	/U·L ⁻¹
模型空白	-	-	14.71 ± 3.83	1 568.63 ± 283.24
假手术空白	-	-	0 ²⁾	517.13 ± 207.60 ²⁾
SSNX	180	30	7.78 ± 1.86 ²⁾	605.38 ± 169.64 ²⁾
	90	30	7.80 ± 1.86 ²⁾	540.25 ± 190.16 ²⁾
	45	30	8.19 ± 1.36 ²⁾	1 124.50 ± 393.10
	180	90	6.64 ± 2.27 ²⁾	529.25 ± 137.64 ²⁾
	90	90	8.05 ± 1.77 ²⁾	1 106.00 ± 439.47
	45	90	8.62 ± 2.51 ²⁾	1 563.00 ± 608.43
	180	150	8.00 ± 2.36 ²⁾	590.00 ± 323.26 ²⁾
	90	150	9.26 ± 1.27 ²⁾	1 382.88 ± 239.55
	45	150	9.74 ± 2.41 ²⁾	1 444.75 ± 620.11

注:与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。



与模型血清组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;“空白”代表模型血清中的假手术空白组,正常血清中的正常空白组;组别中 H 代表 $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, M 代表 $90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, L 代表 $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;30,90,150 分别代表药后 30,90,150 min 取血

图 1 SSNX 模型血清与正常血清对 H9C2 心肌细胞活力抑制率影响比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

4 讨论

目前制备中药血清多采用正常动物口饲给药后采血,观察含药血清对正常或病理状态下的离体器官、组织、细胞或体外培养的细胞的作用。但是,中药复方经口给予后在消化道、肝脏的代谢以及在消化道的吸收,由于状态的不同,很可能存在差别,这种代谢和吸收的个体与状态的差别形成作用部位有效成分的血中浓度差。因此,研究病理状态下中药复方含药血清的效应其结果可能更真实^[5-7]。

本实验比较了正常状态及心肌缺血病理状态下大鼠的血清对于缺氧/复氧 H9C2 心肌细胞活力的影响。首先建立大鼠心肌缺血模型,通过心肌缺血面积、血清 LDH 漏出率与假手术组比较差异显著证实模型建立成功。然后制备模型空白及含药血清。同时给予正常大鼠相同给药方式及方法,制备正常空白及含药血清。观察 2 种方法制备的血清对于缺氧/复氧 H9C2 心肌细胞活力抑制率的影响。

实验数据提示模型空白血清与假手术空白血清对缺氧/复氧细胞活力的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明大鼠受心肌缺血损伤刺激后,其血清对细胞的影响与损伤前不同。损伤模型更接近于疾病状态,故损伤后再给予药物干预更为合理。其次,细胞活力结果显示,模型含药血清 3 个时间点的高、中剂量组,正常含药血清 3 个时间点的高、中、低剂量组,能够显著提高缺氧/复氧心肌细胞活力。说明 2 种方法所得的药效结果不相同。经统计学分析,分别比较 2 种方法对应时间点及相应剂量血清对细胞活力的作用,均差异显著 ($P < 0.05$)。整体趋势为正常含药血清作用优于模型含药血清作用。可见,动物状态的不同导致了最终药效的不同,病理损伤

模型下制备的含药血清对细胞的作用结果更接近临床实际。

本次实验采用多个时间点采血。为进一步测定各组血清药物成分含量及进行后期相关研究,说明 2 种方法血清对细胞作用不同原因做前期准备。本次结果提示,SSNX 模型含药血清与正常含药血清细胞实验最佳药效时间点趋势一致,均为药后 90 min 时。与本实验室之前 SSNX 血清药理学研究结果一致^[3-4],并为后期结合血清药物成分测定结果,研究 SSNX 物质作用基础提供依据。

[参考文献]

- [1] 刘建勋,于震,李欣志.双参宁心方对心导管介入血栓法制备小型猪心肌缺血模型的影响[J].中国中西医结合杂志,2006,26(8):728.
- [2] 于震,刘建勋,李欣志,等.双参宁心方对血栓性心肌缺血小型猪心室重构和室壁运动的影响[J].中国药理学通报,2008,24(2):178.
- [3] 韩笑,刘建勋.双参通冠方药物血清对缺氧/复氧心肌细胞 Ca^{2+} , CaM, CaMPK II 信号系统的影响[J].中国药理学通报,2006,22(7):876.
- [4] 刘建勋,韩笑,孙宇洋.双参通冠方药物血清对心肌细胞缺氧复氧损伤 Ca^{2+} 超载的影响[J].中国中药杂志,2006,31(8):697.
- [5] 贾波,石含秀,沈涛.中药血清药理学研究方法探讨与思考[J].浙江中西医结合杂志,2009,19(5):319.
- [6] 郭功玲,李吉华.中药血清药理学实验方法研究进展[J].山东医药,2008,48(48):116.
- [7] 宋珏,路通,谢林,等.黄连解毒汤抗氧化作用的血清药理学研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(4):118.

[责任编辑 聂淑琴]